

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5554244号
(P5554244)

(45) 発行日 平成26年7月23日 (2014. 7. 23)

(24) 登録日 平成26年6月6日 (2014. 6. 6)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 38/24 (2006. 01)	A 6 1 K 37/38
A 6 1 K 9/08 (2006. 01)	A 6 1 K 9/08
A 6 1 K 47/22 (2006. 01)	A 6 1 K 47/22
A 6 1 K 47/10 (2006. 01)	A 6 1 K 47/10
A 6 1 K 47/12 (2006. 01)	A 6 1 K 47/12

請求項の数 13 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-536677 (P2010-536677)	(73) 特許権者	000002990
(86) (22) 出願日	平成21年11月2日 (2009. 11. 2)		あすか製薬株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/005809		東京都港区芝浦二丁目5番1号
(87) 国際公開番号	W02010/052879	(74) 代理人	110000109
(87) 国際公開日	平成22年5月14日 (2010. 5. 14)		特許業務法人特許事務所サイクス
審査請求日	平成24年9月27日 (2012. 9. 27)	(72) 発明者	浅田 一
(31) 優先権主張番号	特願2008-283079 (P2008-283079)		神奈川県川崎市高津区下作延5-36-1
(32) 優先日	平成20年11月4日 (2008. 11. 4)		あすか製薬株式会社 川崎事業所内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	片岡 弘臣
(31) 優先権主張番号	特願2009-216563 (P2009-216563)		神奈川県川崎市高津区下作延5-36-1
(32) 優先日	平成21年9月18日 (2009. 9. 18)		あすか製薬株式会社 川崎事業所内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

審査官 中尾 忍

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 卵胞刺激ホルモン含有水性組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

卵胞刺激ホルモン及び安定化剤としてヒスチジン及びメチオニンを含む水性組成物。

【請求項 2】

ヒスチジンの濃度が0.05~10.0mg/mLである請求項 1 に記載の水性組成物。

【請求項 3】

卵胞刺激ホルモンとして遺伝子組み換えヒト卵胞刺激ホルモンを含む請求項 1 又は 2 に記載の水性組成物。

【請求項 4】

糖類、プロピレングリコール及びクレアチニンからなる群から選ばれる 1 種又は 2 種以上の物質をさらに含む請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の水性組成物。

【請求項 5】

キシリトール、イノシトール、プロピレングリコール、スクロース、グルコン酸カルシウム、グルコン酸ナトリウム、マンニトール、マクロゴール 600 及びクレアチニンからなる群から選ばれる 1 種又は 2 種以上の物質をさらに含む請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の水性組成物。

【請求項 6】

メチオニンの濃度が0.05~10mg/mLである請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の水性組成物。

【請求項 7】

10

20

界面活性剤をさらに含む請求項 1 ないし 6のいずれか 1 項に記載の水性組成物。

【請求項 8】

界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項 7に記載の水性組成物。

【請求項 9】

リン酸緩衝剤又はクエン酸緩衝剤をさらに含む請求項 1 ないし 8のいずれか 1 項に記載の水性組成物。

【請求項 10】

pH が 6.5 ～ 8.0 である請求項 1 ないし 9のいずれか 1 項に記載の水性組成物。

【請求項 11】

等張化剤として塩化ナトリウムをさらに含む請求項 1 ないし 10のいずれか 1 項に記載の水性組成物。

【請求項 12】

ポリカルボン酸としてEDTAをさらに含む請求項 1 ないし 11のいずれか 1 項に記載の水性組成物。

【請求項 13】

卵胞刺激ホルモンを有効成分として含む医薬水性組成物の安定化剤であって、ヒスチジン及びメチオニンを含む安定化剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、卵胞刺激ホルモンを含む安定な水性組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

卵胞刺激ホルモン (Follicle stimulating hormone; 以下、「FSH」と略す場合がある) は下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞で合成・分泌されるホルモンである。FSHは卵巣内で未成熟の卵胞の成長を刺激して成熟させる作用を有しているが、医薬としては生殖補助医療 (Assisted Reproductive Technology; ART) における排卵誘発剤として利用されている。

【0003】

従来、FSH含有組成物として、閉経後の女性の尿から抽出されるヒト閉経期ゴナドトロピン (Human Menopausal Gonadotropin; hMG) 製剤が使用されてきた。このhMG製剤は、FSHと黄体形成ホルモン (Luteinizing Hormone; LH) を含有しており、FSHとLHの活性割合はほぼ 1 : 1 である。最近になって、諸外国では人の尿を原料とせずに遺伝子組換えによって製造した「リコンビナントFSH製剤」が主流となってきており、我が国でも2005年にフォリスチム (登録商標) が承認された。リコンビナント製剤は、尿を原料としないために不純物を含まず、品質が一定していることが特徴である。

【0004】

一方、生理活性タンパク質は水溶液の状態では一般に不安定であり、タンパク質純度が高いほどその傾向は増大する。タンパク質は水溶液中で低分子化合物と同様の加水分解を受けたり、ラセミ化などの化学的变化を起こしたり、さらに高分子化合物であることから高次構造の変化 (物理的变化) を引き起こしたりする。物理的变化としては、変性、凝集、吸着、沈殿などを挙げることができるが、物理的变化の際はまず変性が起こり、それに続いて凝集、吸着、沈殿などの現象が引き起こされるものと考えられる。変性は折りたたみ部位がほどける (unfolding) など立体的構造 (三次及び四次構造) が変化することを意味するが、殆んどの場合には変性が生理活性の喪失につながるもので、タンパク質製剤やペプチド製剤の安定性を高めるためには変性を防止することが重要である。

【0005】

タンパク質製剤における化学的及び物理的变化を抑制するために、安定化剤としてヒト血清アルブミン等の夾雑タンパク質の添加が一般的に行われてきたが、ウィルス混入等の危険性を避けるために、最近ではリコンビナント製剤が主流となりつつあり、リコンビナ

10

20

30

40

50

ント製剤においては夾雑タンパク質の添加に代わる別の安定化方法が種々検討されている。

【0006】

例えば、糖類や界面活性剤、アミノ酸など、タンパク質分子と水素結合したりタンパク質分子の水和を高めたりする作用を持つ化合物を添加してタンパク質製剤の安定性を高めることが検討されている（例えば、Bull. Chem. Soc. Jpn., 53, pp2451-2455, 1980; J. Biol. Chem., 256, pp7193-7201, 1981; Pharm. Res., 10, pp954-962, 1993; Int. J. Pharm., 96, pp41-49, 1993; Pharm. Res., 8, pp1258-1263, 1991; Pharm. Res., 10, pp649-659, 1993などを参照のこと）。このうち、アミノ酸については、例えば、DE-A-2916711号公報にグリシン、 α 又は β -アラニン、プロリン、グルタミン等が血液凝固因子に対して安定化効果を有することが開示されており、米国特許第4440679号明細書には、アルギニン、リジン及び／又はグリシンが第VIII因子、フィブロンネクチン等に対して安定化作用を有することが記載されている。また、DE-A-1985644号公報には、アルギニン、リジン、ヒスチジン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン酸及び／又はグルタミン酸が抗トロンビンIIIに対して安定化効果を有することが開示されている。しかしながら、これらのアミノ酸の安定化効果は、対象となるタンパク質又はペプチドに対して特異的であり、任意のタンパク質又はペプチドに対して最も安定化効果を発揮するアミノ酸や複数のアミノ酸の組み合わせがこれらの知見から予測できるわけではない。

10

【0007】

FSHについては、例えば特許文献1にメチオニンが水性組成物中のゴナドトロピンを安定化させることが記載されている。また、ヒスチジンのタンパク質に対する安定化効果については、例えば、血液凝固因子関連タンパク質（特許文献2）、免疫グロブリン（特許文献3）、エリスロポエチン（特許文献4）等の液体製剤においてヒスチジンが安定化効果を発揮することが知られている。さらに、特許文献5には、安定剤としてのグリシン、メチオニン、非イオン性界面活性剤及びリン酸緩衝剤を含むFSH製剤が開示されている。しかしながら、従来、水性組成物中のFSHに対してヒスチジンが安定化効果を有するか否かは知られていない。また、ヒスチジン及び他のアミノ酸との組合せが水性組成物中のFSHに対して安定化効果を有するか否かも全く知られていない。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0008】

【特許文献1】特開平10-203997号公報

【特許文献2】特開2002-275090号公報

【特許文献3】特表2007-511566号公報

【特許文献4】国際公開WO 02/011753パンフレット

【特許文献5】特表2009-509953号公報

【特許文献6】DE-A-2916711号公報

【特許文献7】米国特許第4440679号明細書

【特許文献8】DE-A-1985644号公報

【非特許文献】

40

【0009】

【非特許文献1】Bull. Chem. Soc. Jpn., 53, pp2451-2455, 1980

【非特許文献2】J. Biol. Chem., 256, pp7193-7201, 1981

【非特許文献3】Pharm. Res., 10, pp954-962, 1993

【非特許文献4】Int. J. Pharm., 96, pp41-49, 1993

【非特許文献5】Pharm. Res., 8, pp1258-1263, 1991

【非特許文献6】Pharm. Res., 10, pp649-659, 1993

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

50

本発明の課題は卵胞刺激ホルモンを含む水性組成物を提供することにある。より具体的には、アミノ酸を用いて水性組成物中で卵胞刺激ホルモンを安定化する手段を提供することが本発明の課題である。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、水溶液の状態の卵胞刺激ホルモンを安定化する物質について鋭意検討したところ、ヒスチジンが極めて優れた安定化効果を有しており、さらに別のアミノ酸、糖類、バッファー等を適宜組み合わせることによりさらに高い安定化効果を達成できることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

【0012】

10

すなわち、本発明により、卵胞刺激ホルモン及び安定化剤であるヒスチジンを含む水性組成物が提供される。

【0013】

本発明の好ましい態様によれば、ヒスチジンの濃度が0.05~10.0mg/mLである上記の水性組成物；ヒスチジンの濃度が0.2~5.0mg/mLである上記の水性組成物；及びヒスチジンの濃度が0.25~2.0mg/mLである上記の水性組成物が提供される。また、本発明の好ましい態様によれば、メチオニンをさらに含む上記の水性組成物が提供され、さらに好ましい態様として、メチオニンの濃度が0.05~10.0mg/mLである上記の水性組成物；メチオニンの濃度が0.2~5.0mg/mLである上記の水性組成物；及びメチオニンの濃度が0.25~2.0mg/mLである上記の水性組成物が提供される。さらに、卵胞刺激ホルモンとして遺伝子組み換えヒト卵胞刺激ホルモンを含む上記の水性組成物も提供される。

20

【0014】

本発明の好ましい態様によれば、糖類、プロピレングリコール及びクレアチニンからなる群から選ばれる1種又は2種以上の物質をさらに含む上記の水性組成物；キシリトール、イノシトール、プロピレングリコール、スクロース、グルコン酸カルシウム、グルコン酸ナトリウム、マンニトール、マクロゴール600及びクレアチニンからなる群から選ばれる1種又は2種以上の物質をさらに含む上記の水性組成物が提供される。

【0015】

より好ましい態様によれば、界面活性剤をさらに含む上記の水性組成物が本発明により提供される。さらに好ましい態様として、界面活性剤がイオン性界面活性剤、両面界面活性剤及び非イオン性界面活性剤からなる群から選ばれる界面活性剤である上記の水性組成物；界面活性剤が非イオン性界面活性剤である上記の水性組成物；界面活性剤がTween80及び／又はTween20である上記の水性組成物；及び界面活性剤がTween80である上記の水性組成物が本発明により提供される。

30

【0016】

別の好ましい態様によれば、緩衝剤をさらに含む上記の水性組成物が本発明により提供される。より好ましい態様によれば、リン酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、酒石酸緩衝剤及びトリス緩衝剤からなる群から選ばれる緩衝剤を含む上記の水性組成物；リン酸緩衝剤又はクエン酸緩衝剤を含む上記の水性組成物；及びpHが6.5~8.0、好ましくはpHが7.0~7.8である上記の水性組成物；等張化剤を含む上記の水性組成物；等張化剤が塩化ナトリウムである上記の水性組成物；EDTA、クエン酸、フィチン酸、リンゴ酸及びグルコン酸からなる群から選ばれるポリカルボン酸をさらに含む上記の水性組成物；ポリカルボン酸がEDTAである上記の水性組成物；水性媒体がリン酸緩衝生理食塩水である上記の水性組成物が提供される。

40

【0017】

別の観点からは、卵胞刺激ホルモンを有効成分として含む水溶液の安定化剤であって、ヒスチジンを含む安定化剤；並びにヒスチジン及びメチオニンを含む安定化剤が本発明により提供される。

さらに別の観点からは、卵胞刺激ホルモンを有効成分として含む水溶液の安定化方法であって、該水溶液にヒスチジン及びメチオニンを添加する工程；並びにヒスチジン及びメ

50

チオニンを添加する工程を含む方法が本発明により提供される。

【発明の効果】

【0018】

本発明の水性組成物では卵胞刺激ホルモンがヒスチジンにより安定化されており、卵胞刺激ホルモンの化学的及び物理的变化が実質的に軽減ないし排除されているので、保存及び流通段階での活性低下を回避した安定な医薬組成物として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、10mMのPBSに、遺伝子組み換えFSHを150IU/mL、スクロースを50mg/mL及びTween80を0.01%となるように加え、さらにヒスチジンを加えた卵胞刺激ホルモン含有水性組成物を40℃にて8週間保存した場合と、10mMのPBSに、遺伝子組み換えFSHを150IU/mL及びTween80を0.01%加えた卵胞刺激ホルモン含有水性組成物を5℃又は40℃にて8週間保存した場合のHPLCチャートのα-サブユニット及びβ-サブユニット付近の拡大図である。

10

【図2】図2は、10mMのPBSに、遺伝子組み換えFSHを150IU/mL、スクロースを50mg/mL及びTween80を0.01%となるように加え、さらにメチオニンを加えた卵胞刺激ホルモン含有水性組成物を40℃にて8週間保存した場合と、10mMのPBSに、遺伝子組み換えFSHを150IU/mL及びTween80を0.01%加えた卵胞刺激ホルモン含有水性組成物を5℃又は40℃にて8週間保存した場合のHPLCチャートのα-サブユニット及びβ-サブユニット付近の拡大図である。

【図3】図3は、10mMのPBSに、遺伝子組み換えFSHを150IU/mL、スクロースを50mg/mL及びTween80を0.01%となるように加え、さらにメチオニン及びヒスチジンを加えた卵胞刺激ホルモン含有水性組成物を40℃にて8週間保存した場合と、10mMのPBSに、遺伝子組み換えFSHを150IU/mL及びTween80を0.01%加えた卵胞刺激ホルモン含有水性組成物を5℃又は40℃にて8週間保存した場合のHPLCチャートのα-サブユニット及びβ-サブユニット付近の拡大図である。

20

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明においては、ヒト尿から分離される天然由来の卵胞刺激ホルモンも使用することができるが、純度の高い卵胞刺激ホルモンを用いる場合に本発明の効果が顕著に奏されることから、高度に精製された卵胞刺激ホルモン、好ましくは高度に精製され実質的に単一物質である卵胞刺激ホルモンを用いることが好ましい。このような観点から、本発明においては、卵胞刺激ホルモンとして遺伝子組み換え手法により調製された実質的に夾雑タンパク質を含まないヒト卵胞刺激ホルモンを用いることが好ましい。

30

【0021】

本発明の水性組成物における卵胞刺激ホルモンの濃度は特に限定されないが、例えば、50～500IU/mL、好ましくは100～300IU/mL程度である。卵胞刺激ホルモンの国際単位（IU）については、NIBSC（National Institute for Biological Standards and Control）のFSH国際標準品に関する文書（<http://www.nibsc.ac.uk/documents/ifu/98-704.pdf>）などに記載されている。

【0022】

本発明の水性組成物におけるヒスチジンの濃度も特に限定されないが、例えば、0.05～10.0mg/mL、好ましくは0.2～5.0mg/mL、さらに好ましくは0.25～2.0mg/mL程度である。また、本発明の水性組成物におけるメチオニンの濃度も特に限定されないが、例えば、0.05～10.0mg/mL、好ましくは0.2～5.0mg/mL、さらに好ましくは0.25～2.0mg/mL程度である。

40

【0023】

本発明の水性組成物は、糖類、プロピレングリコール及びクレアチニンからなる群から選ばれる1種又は2種以上の物質をさらに含んでもよい。糖類としては、単糖、二糖、糖アルコール、アルドン酸又はその塩、シクリトール、マクロゴールなどを用いることができる。単糖としては、例えば、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、キシロース、トレオース等を挙げることができ、二糖としては、例えば、スクロース、マルトース、ラクトース、セロビオース、トレハロース等を挙げることができ、糖アルコ

50

ールとしては、例えば、マンニトール、キシリトール、ソルビトール、エリスリトール、グリセリン等を挙げることができる。アルドン酸又はその塩としては、例えば、グルコン酸、ガラクトン酸、マンノン酸等又はそれらの塩を挙げることができ、シクリトールとしては、イノシトールを挙げることができ、マクロゴールとしては、マクロゴール200、マクロゴール300、マクロゴール400、マクロゴール600、マクロゴール1000、マクロゴール1500、マクロゴール1540、マクロゴール4000、マクロゴール6000、マクロゴール10000、マクロゴール20000等を挙げることができる。

【0024】

本発明の水性組成物は、好ましくは、キシリトール、イノシトール、プロピレングリコール、スクロース、グルコン酸カルシウム、グルコン酸ナトリウム、マンニトール、マクロゴール600及びクレアチニンからなる群から選ばれる1種又は2種以上の物質を含むことができる。

10

【0025】

本発明の水性組成物において、糖類としてスクロース、マンニトール又はイノシトールを含む場合には、例えば、25~125mg/mL程度の濃度で用いることができ、好ましくは50~100mg/mL程度の濃度で添加することができる。糖類としてキシリトールを含む場合には、例えば、1~100mg/mL程度の濃度で用いることができ、好ましくは5~75mg/mL程度の濃度で添加することができる。糖類としてグルコン酸カルシウム又はグルコン酸ナトリウムを含む場合には、例えば、0.2~75mg/mL程度の濃度で用いることができ、好ましくは1~50mg/mL程度の濃度で添加することができる。糖類としてマクロゴール600を含む場合には、例えば、0.2~75mg/mL程度の濃度で用いることができ、好ましくは1~50mg/mL程度の濃度で添加することができる。プロピレングリコールを含む場合には、例えば、1~100mg/mL程度の濃度で用いることができ、好ましくは5~75mg/mL程度の濃度で添加することができる。クレアチニンを含む場合には、例えば、0.1~50mg/mL程度の濃度で用いることができ、好ましくは0.5~30mg/mL程度の濃度で添加することができる。

20

【0026】

本発明の水性組成物は1種又は2種以上の界面活性剤を含んでいてもよい。界面活性剤の種類は特に限定されないが、イオン性界面活性剤、両性界面活性剤及び非イオン性界面活性剤からなる群から選ばれる1種又は2種以上の界面活性剤を用いることができる。界面活性剤の濃度は特に限定されないが、水性組成物の全容量に対して0.001~0.1%程度の濃度で用いることができ、好適には0.005~0.05%程度の濃度で添加することができる。

30

【0027】

イオン性界面活性剤としては、例えば、コール酸、デオキシコール酸等が挙げられ、両性界面活性剤としては、例えば、CHAPS (3-[(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)、CHAPSO (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate) 等が挙げられ、非イオン性界面活性剤としては、例えば、Tween (登録商標)、TRITON (登録商標)、PLURONIC (登録商標)、カルボワックス (登録商標) 等が挙げられる。なお、非イオン性界面活性剤の具体例として挙げた名称は総称であり、例えば、TweenとしてはTween20、Tween40、Tween60、Tween80等の製品名を挙げることができる。これらのうち、本発明においては非イオン性界面活性剤を用いることが好ましく、非イオン性界面活性剤のうちTween20及びTween80がより好ましく、特にTween80が好適である。

40

【0028】

本発明の水性組成物はさらに緩衝剤を含んでいてもよく、例えば、リン酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、酒石酸緩衝剤及びトリス緩衝剤からなる群から選ばれる緩衝剤を含むことができ、好ましくはクエン酸緩衝剤又はリン酸緩衝剤を含むことができる。

【0029】

クエン酸緩衝剤を用いる場合には、例えば10~250mM程度の濃度で用いることができ、好ましくは25~75mM程度の濃度で添加することができる。リン酸緩衝剤又はリン酸緩衝生理食塩水を用いる場合には、例えば2~50mM程度の濃度で用いることができ、好ましくは5

50

～15mM程度の濃度で添加することができる。本発明の水性組成物のpHは特に限定されないが、例えばpHが6.5～8.0、好ましくは7.0～7.8となるように調製することができ、適宜のpH調節剤、例えば塩酸や水酸化ナトリウムなどで所望のpHとなるように調節することができる。本発明の水性組成物は体液と等張になるように調製されることが好ましく、この目的で等張化剤を含むことができる。等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン等を用いることができ、好ましくは塩化ナトリウムを用いることができる。

【0030】

本発明の水性組成物はEDTA、クエン酸、フィチン酸、リンゴ酸、グルコン酸からなる群から選ばれるポリカルボン酸を含んでいてもよく、好ましくはEDTAを含むことができる。キレート剤を含む場合には、例えば0.1～10.0mg/mL程度の濃度で用いることができ、好ましくは0.2～5.0mg/mL程度の濃度で添加することができる。

10

【0031】

また、本発明の水性組成物における水性媒体として、例えば、水、注射用蒸留水、生理食塩水、リン酸緩衝剤、リン酸緩衝生理食塩水等を用いることができ、好ましくはリン酸緩衝生理食塩水を用いることができる。

【0032】

本発明の水性組成物の調製方法は特に限定されないが、例えば、卵胞刺激ホルモン及びヒスチジンを水、注射用蒸留水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水等の適宜の水性媒体に溶解し、必要に応じて上記に説明したアミノ酸、糖類、プロピレングリコール、クレアチニン、界面活性剤、緩衝剤、pH調節剤、等張化剤等の1種又は2種以上を適宜添加することにより調製することができる。また、必要に応じて濾過滅菌等の滅菌操作を行い、注射用の水性組成物を調製することができる。本発明の水性組成物は、例えば、注射用の医薬組成物として、不妊治療等に用いることができる。

20

【実施例】

【0033】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1：アミノ酸についての残存率の検討

50 mMのクエン酸緩衝剤、10 mMのリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline；PBS）又は10mMのリン酸緩衝剤（Phosphate buffer；PB）に、遺伝子組み換えFSHを150 IU/mL、スクロースを50 mg/mL、及びTween80を0.01%となるように加え、さらに下記表1に示すように緩衝剤及びアミノ酸（濃度は0.5 mg/mL）を組み合わせることで水性組成物を調製した。このうちの0.5 mLを2 mL容量の容器に入れて密閉し、50℃にて2週間保存した。2週間経過後のFSHの量をイムノアッセイにより測定し、実験開始時のFSHの量に対する比（残存率）を算出した。結果を下記表1に示す。

30

【0034】

【表 1】

試験例番号	アミノ酸(0.5mg/mL)	緩衝剤	残存率
例 1-1	ヒスチジン	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	71%
例 1-2		PBS (10 mM, pH7.4)	76%
例 1-3		PB (10 mM, pH7.4)	60%
比較例 1-1	メチオニン	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	69%
比較例 1-2		PBS (10 mM, pH7.4)	70%
比較例 1-3	アスパラギン酸ナトリウム	PBS (10 mM, pH7.4)	56%
比較例 1-4	アラニン	〃	55%
比較例 1-5	塩酸システイン	〃	2%
比較例 1-6	グリシン	〃	70%
比較例 1-7	グルタミン	〃	60%
比較例 1-8	グルタミン酸塩酸塩	〃	56%
比較例 1-9	グルタミン酸ナトリウム	〃	54%
比較例 1-10	酸化型グルタチオン	〃	59%
比較例 1-11	シスチン	〃	38%
比較例 1-12	シスチン二塩酸塩	〃	43%
比較例 1-13	システイン酸	〃	47%
比較例 1-14	セリン	〃	54%
比較例 1-15	チロシン	〃	40%
比較例 1-16	トリプトファン	〃	41%
比較例 1-17	フェニルアラニン	〃	44%
比較例 1-18	プロリン	〃	52%
比較例 1-19	ロイシン	〃	58%

例 2：アミノ酸の組み合わせについての残存率の検討

10mMのPBSに、遺伝子組み換えFSHを150IU/mL、スクロースを50mg/mL及びTween80を0.01%となるように加え、さらに下記表2に示すようにヒスチジン及び／又はメチオニンをそれぞれの濃度となるように加えて水性組成物を調製した。また、対照として、10mMのPBSに、遺伝子組み換えFSHを150IU/mL及びTween80を0.01%となるように加えた水性組成物を調製した。これらのうちの0.5mLを2ml容量の容器に入れて密閉し、40℃にて8週間保存した。実験開始時、5週間経過後及び8週間経過後の水性組成物を逆相HPLCにより測定し（8週間経過後のHPLCチャートを図1～3に示す）、得られたα-サブユニット及びβ-サブユニットのピーク面積値を、FSH標準品（-80℃で保存してある10μg/mLの遺伝子組み換えFSH凍結液を用時溶解したもの）における各サブユニットのピーク面積値に基づいて補正した。そして、各期間経過後の水性組成物における各サブユニットの残存率を、実験開始時の各サブユニットの量に対する比で算出した。なお、FSHの量は、各サブユニットのピーク面積値を合計することにより算出した。結果を下記表2に示す。

【0035】

【表 2】

試験例番号	アミノ酸	残存率 (%)		
			5 週間	8 週間
例 2 - 1	ヒスチジン (0.5mg/mL)	α -サブユニット	86.3	79.8
		β -サブユニット	87.8	86.6
		FSH	87.1	83.4
比較例 2	メチオニン (0.5mg/mL)	α -サブユニット	112.1	104.9
		β -サブユニット	87.0	70.6
		FSH	99.2	87.2
例 2 - 2	ヒスチジン (0.5mg/mL) + メチオニン (0.5mg/mL)	α -サブユニット	112.2	110.0
		β -サブユニット	98.2	93.8
		FSH	104.8	101.5
対照	—	α -サブユニット	60.3	56.0
		β -サブユニット	44.0	39.0
		FSH	51.7	47.1

【0036】

この測定結果より、ヒスチジンは β -サブユニットに対して、メチオニンは α -サブユニットに対して、それぞれ安定化効果が高いことがわかる。そして、ヒスチジンとメチオニンの両方を安定化剤として含むFSH製剤は極めて安定である。

例 3：ヒスチジンの濃度についての残存率の検討

50 mMのクエン酸緩衝剤又は10 mMのPBSに、遺伝子組み換えFSHを150 IU/mL、スクロースを50 mg/mL、及びTween80を0.01%となるように加え、これに下記表3に示す組み合わせとなるようにヒスチジンを添加してそれぞれ組成物を調製し、例 1と同様にして残存率を検討した。結果を下記表3に示す。

【0037】

【表 3】

試験例番号	ヒスチジン濃度	緩衝剤	残存率
例 3 - 1 (比較例)	0 mg/mL	PBS (10 mM, pH7.4)	60%
例 3 - 2	0.2 mg/mL	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	71%
例 3 - 3		PBS (10 mM, pH7.4)	68%
例 1 - 1	0.5 mg/mL	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	71%
例 1 - 2		PBS (10 mM, pH7.4)	76%
例 1 - 3		PB (10 mM, pH7.4)	60%
例 3 - 4	1.0 mg/mL	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	74%
例 3 - 5		PBS (10 mM, pH7.4)	73%
例 3 - 6	2.0 mg/mL	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	71%
例 3 - 7		PBS (10 mM, pH7.4)	75%
例 3 - 8	3.2 mg/mL	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	74%
例 3 - 9		PBS (10 mM, pH7.4)	70%

【0038】

例 4：糖類についての残存率の比較検討

50 mMのクエン酸緩衝剤又は10 mMのPBSに、遺伝子組み換えFSHを150 IU/mL、ヒスチジ

ンを0.5 mg/mL、及びTween80を0.01%となるように加え、これに下記表4に示す組み合わせとなるように糖類、プロピレングリコール、又はクレアチニンを添加してそれぞれ組成物を調製し、例1と同様にして残存率を検討した。結果を下記表4に示す。比較例としてヒスチジンを添加しない場合の結果も示した。

【0039】

【表 4】

試験例番号	糖類 (濃度)	緩衝剤	残存率
例 1-1	スクロース (50 mg/mL)	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	71%
例 1-2	〃	PBS (10 mM, pH7.4)	76%
例 4-1	スクロース (10 mg/mL)	〃	70%
例 4-2	イノシトール (50 mg/mL)	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	79%
例 4-3	〃	PBS (10 mM, pH7.4)	78%
例 4-4	イノシトール (10 mg/mL)	〃	70%
例 4-5	キシリトール (50 mg/mL)	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	79%
例 4-6	〃	PBS (10 mM, pH7.4)	81%
例 4-7	キシリトール (10 mg/mL)	〃	64%
例 4-8	グリセリン (50 mg/mL)	〃	37%
例 4-9	グルコース (50 mg/mL)	〃	56%
例 4-10	グルコン酸カルシウム (1 mg/mL)	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	70%
例 4-11	〃	PBS (10 mM, pH7.4)	73%
例 4-12	グルコン酸カルシウム (0.2 mg/mL)	〃	68%
例 4-13	クレアチニン (25 mg/mL)	〃	69%
例 4-14	クレアチニン (5 mg/mL)	〃	71%
例 4-15	ソルビトール (50 mg/mL)	〃	67%
例 4-16	デキストラン 70 (50 mg/mL)	〃	59%
例 4-17	フルクトース (50 mg/mL)	〃	21%
例 4-18	プロピレングリコール (50 mg/mL)	〃	78%
例 4-19	マクロゴール 400 (50 mg/mL)	〃	67%
例 4-20	マクロゴール 600 (50 mg/mL)	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	67%
例 4-21	〃	PBS (10 mM, pH7.4)	72%
例 4-22	マクロゴール 600 (10 mg/mL)	〃	67%
例 4-23	マクロゴール 4000 (50 mg/mL)	〃	61%
例 4-24	マルトース (50 mg/mL)	〃	58%
例 4-25	マンニトール (50 mg/mL)	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	80%
例 4-26	〃	PBS (10 mM, pH7.4)	73%
例 4-27	マンニトール (10 mg/mL)	〃	70%
例 4-28	ラクトース (50 mg/mL)	〃	54%
比較例 4-1	スクロース (50 mg/mL)	〃	60%
比較例 4-2	イノシトール (50 mg/mL)	〃	56%
比較例 4-3	キシリトール (50 mg/mL)	〃	63%
比較例 4-4	グルコン酸カルシウム (1 mg/mL)	〃	76%
比較例 4-5	グルコン酸カルシウム (0.2 mg/mL)	〃	55%
比較例 4-6	クレアチニン (25 mg/mL)	〃	54%
比較例 4-7	クレアチニン (5 mg/mL)	〃	61%
比較例 4-8	マクロゴール 600 (50 mg/mL)	〃	32%
比較例 4-9	マクロゴール 600 (10 mg/mL)	〃	71%
比較例 4-10	マンニトール (50 mg/mL)	〃	64%

【0040】

例 5：界面活性剤についての残存率の比較検討

10

20

30

40

50

50 mMのクエン酸緩衝剤、10 mMのPBS又は10 mMのPBに、遺伝子組み換えFSHを150 IU/mL、ヒスチジンを0.5 mg/mL、及びスクロースを50 mg/mLとなるように加えた後、下記表5に示すように緩衝剤及び界面活性剤を組み合わせる組成物を調製し、例1と同様にしてそれぞれの組成物におけるFSHの残存率を検討した。結果を下記表5に示す。比較例として、ヒスチジン0.5 mg/mLの代わりにメチオニン0.5 mg/mLを添加した場合の結果も示した。なお、安定性は実験開始時のFSHの量に対する2週間経過後のFSHの量で示したが、界面活性剤を添加しない場合にはバイアル瓶に入れた段階で吸着等が起こり、FSHの量がその時点で界面活性剤を添加した場合に比べて約80%程度に減少していた。

【0041】

【表5】

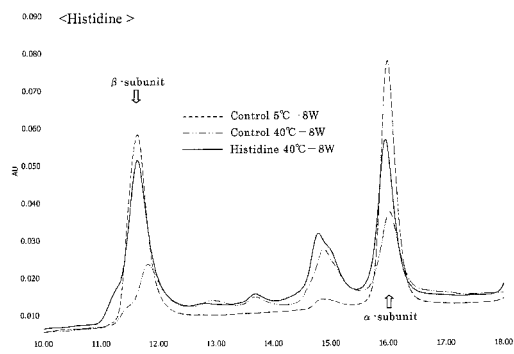
実施例番号	界面活性剤	緩衝剤	残存率
例1-1	Tween80 (0.01%)	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	71%
例1-2		PBS (10 mM, pH7.4)	76%
例1-3		PB (10 mM, pH7.4)	60%
比較例1-1		クエン酸 (50 mM, pH7.4)	69%
比較例1-2		PBS (10 mM, pH7.4)	70%
例5-1	Tween20 (0.01%)	クエン酸 (50 mM, pH7.4)	77%
例5-2		PBS (10 mM, pH7.4)	73%
例5-3		PB (10 mM, pH7.4)	58%
比較例5-1		クエン酸 (50 mM, pH7.4)	72%
例5-4	なし	PBS (10 mM, pH7.4)	65%
例5-5		PB (10 mM, pH7.4)	46%

【産業上の利用可能性】

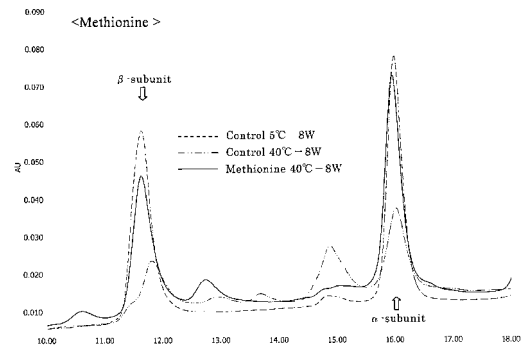
【0042】

本発明の水性組成物は保存及び流通段階での活性低下を回避した安定な医薬組成物として有用である。

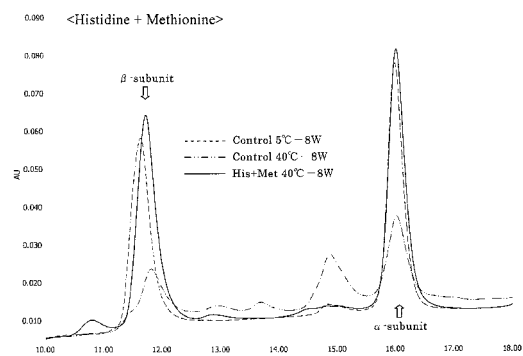
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K 47/26
A 6 1 K	47/04	(2006.01)	A 6 1 K 47/04
A 6 1 P	15/08	(2006.01)	A 6 1 P 15/08

(56)参考文献 国際公開第2007/037607 (WO, A1)
特開平10-203997 (JP, A)
国際公開第02/011753 (WO, A1)
特開平08-333277 (JP, A)
特表平04-502017 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K	3 8 / 2 4
A 6 1 K	9 / 0 8
A 6 1 K	4 7 / 0 4
A 6 1 K	4 7 / 1 0
A 6 1 K	4 7 / 1 2
A 6 1 K	4 7 / 2 2
A 6 1 K	4 7 / 2 6

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)